

II ウイルス学的研究

SMON のウイルス学的研究 —1971—

井上幸重, 西部陽子, 中村良子 (京大ウイルス研)
木村輝男 (大阪市衛研)

I. 序

われわれはこれまでに行ってきたSMONのウイルス学的研究結果から, われわれが分離した新種のウイルスをSMONの病因と考えている。今年度の報告は分離ウイルスの性状に関するその後の研究成績並びにC57BL/6マウスにおけるウイルスの病原性に関するものである。また, 配分された研究費は40万円である。

II. 研究材料並びに方法

1970年度の報告に記載したものは省略する。

1. Human diploid cell ; T6L細胞として東大薬学部山田教授より分与をうけたものであり, BAT-6細胞と同じ培養方法で供試した。

2. ³H. 標識ウイルス: BAT-6細胞をmaintenance mediumで液交換して2日後にウイルスを感染, 同時に³H-thymidine又は³H-uridineを1μC/ml濃度に加えて3日間ラベルした。

3. ウイルスの精製: infected fluidの10,000rpm 30分の遠心上清を28,000rpm 100分遠心し(HITACHI, RP30ローター), 生じたpelletを最初の1/500容量のphosphate buffer saline(PH6.5)にsuspendし15秒間sonicationを行った。5,000rpm 30分の遠心上清を15~35% CsCl density gradientにかけ24,000rpm 180分遠心した(HITACHI, RPS25ローター)。tube底部よりfractionをとり一部は直ちにmaintenance mediumに稀釈して感染価測定を行った。また一部はacid-insoluble部につきradio activityをカウントした。

4. VSVとの干渉: vesicular stomatitis virus(VSV)は名大無菌研の永田教授より分与をうけた。BAT-6細胞にウイルスを接種後, VSVをchallengeし2日後にVSVのCPEを指標として干渉の有無を判定した。即ち, 対照VSVのCPEがgrade4のとき2以下のものを干渉(+)とした。

5. ホルマリン不活化ワクチン: 局方ホルマリンを0.05%になるように加えて4℃30日間不活化したものをホルマリン不活化ウイルスワクチンとした。

6. ワクチン免疫原性テスト: 成熟ddマウス(5週)に不活化ワクチンを0.5ml宛腹腔内接種した。免疫回数は1~4回, 最終免疫から7日後に採血して中和抗体を測定した。

7. マウス感染実験: dd, C57BL/6, CF1 strainの新生児マウスを供試した。とくにC57BL/6マウスは京大ウイルス研前田博士, 愛知ガンセンター石本博士, 並びに京大医学部解剖

西村教授の好意によって分与された。ウイルス接種後2~3ヶ月間観察すると共に、1週間以内の死亡マウスは観察結果から除外した。

8. マウスに接種したウイルス材料：供試ウイルス材料は以下のものである。

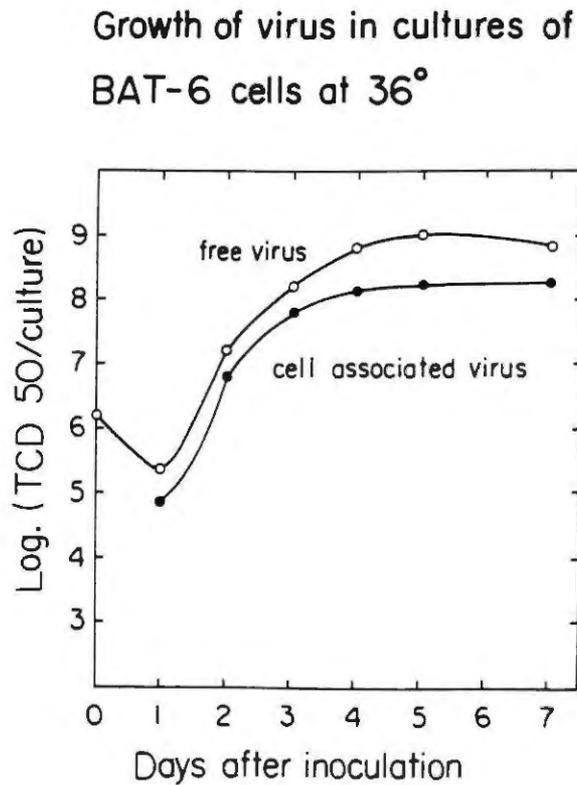
(株名)	(患者材料)	(分離材料)
Sato	岡山の患者糞便	BAT-6細胞
Watanabe	北海道の患者髄液	human diploid cell
Aoki	大阪の患者髄液	human diploid cell
Nishimata	北海道の患者髄液	直接マウス
Kishimoto	岡山の患者髄液	直接マウス

9. 病理検査：発病あるいは対照マウスは4% paraformaldehyde加Millonig buffer (pH7.0) で環流固定、パラフィン切片としてHematoxylin-eosin, Luxol-fast-blue, 並びにBodian染色を施した。病理学的研究は京大精神科の松岡龍典博士並びに同研究グループの指導を戴くと共に、多くの病理学者の助言によって行った。

Ⅲ. 分離ウイルスの性状—1971—

1. BAT-6細胞における増殖：図1に示すごとくウイルスは容易に液相に放出され、液相中のウイルス感染価は早くからcell associated virusより高い価を示す。

図1



2. HeLa 細胞並びにhuman diploid細胞における増殖：図2並びに図3に示すごとく，ウイルスは両細胞においてCPEを示すことなく増殖する。ウイルスは除々に液相に放出され感染後期にはcell associated virusより高い価を示す。

図2 Growth curves in HeLa cell cultures at 36°C

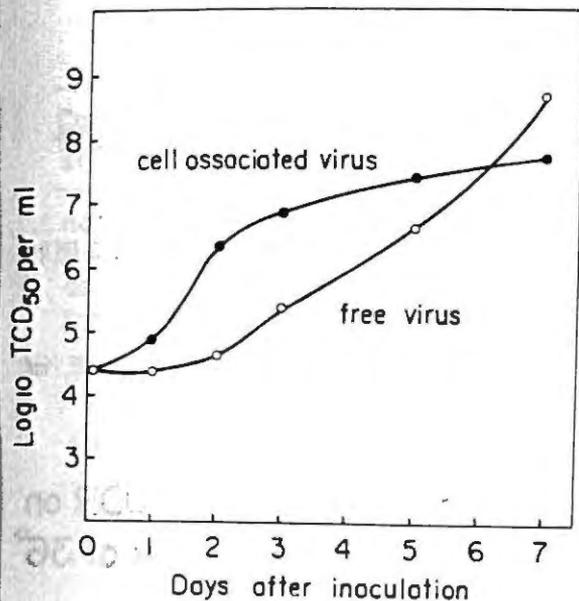
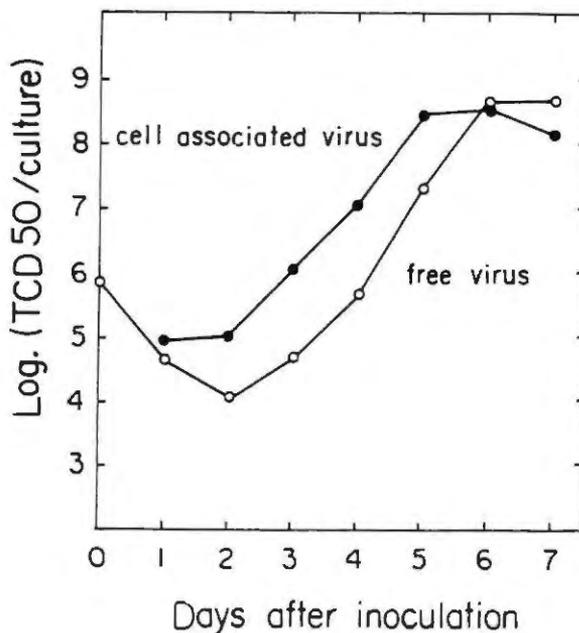


図3 Growth of virus in cultures of human diploid cells at 36°C



3. Human diploid cellによるウイルス分離：患者髄液から直接human diploid cellへのウイルス分離の結果は表1に示すごとく，ウイルスはCPEを示すことなく分離継代される。ウイルスの感染価測定にのみBAT-6細胞を用いた。また供試髄液はいずれも初代サル腎細胞，HeLa細胞に対してもCPEを示さない。human diploid cellに分離したAoki並びにWatanabe株とBAT-6細胞に分離したSato株並びにKishimoto株は交

表1 Isolation of the virus from spinal fluid of S.M.O.N. patients and passage in human diploid (T6L) cells

Log. (TC50/0.1ml.) of spinal fluid		No. of passage in T6L cells	Cumulative log dilution of first inoculum	Log. (TC50/0.1ml.) of culture fluid from uninfected cells
Strain Aoki	Strain Watanabe			
4.5	4.5	0		<0.5
5.5	5.3	1	2.3	<0.5
6.3	6.3	2	4.6	
6.8	6.8	3	6.9	
6.8	6.8	4	9.2	
6.3	5.5	5	11.5	

表2 Cross reactions among the viruses isolated from S.M.Q.N. patients in different places

Virus strain	Place isolated	Challenge TC D ₅₀	Dilution for 50% reduction of TCD ₅₀	
			Anti-Sato rabbit ser.	Anti-Watanabe guinea pig ser.
Sato, from faeces	Okayama	100 200	1,280	320
Kishimoto, from spinal fluid	Okayama	300	600	160
Aoki, from spinal fluid	Osaka	100	2,560	320
Watanabe from spinal fluid	Hokkaido	50 100	2,560	320

差中和試験によって同一のものであり、また地域を異にする S M O N 患者から同一のウイルスが分離されることを表2は示している。

4. 紫外線によるウイルスの不活化：ウイルス浮遊液は10 cmの距離で20 W殺菌灯による照射で図4に示すごとく急速に不活化される。

5. IUDR, FUDRの影響：DNA合成阻害剤であるIUDRあるいはFUDR 30 μg/ml存在下におけるウイルスの増殖は図5に示すごとく抑制される。

図4 Inactivation of virus infectivity by UV- irradiation

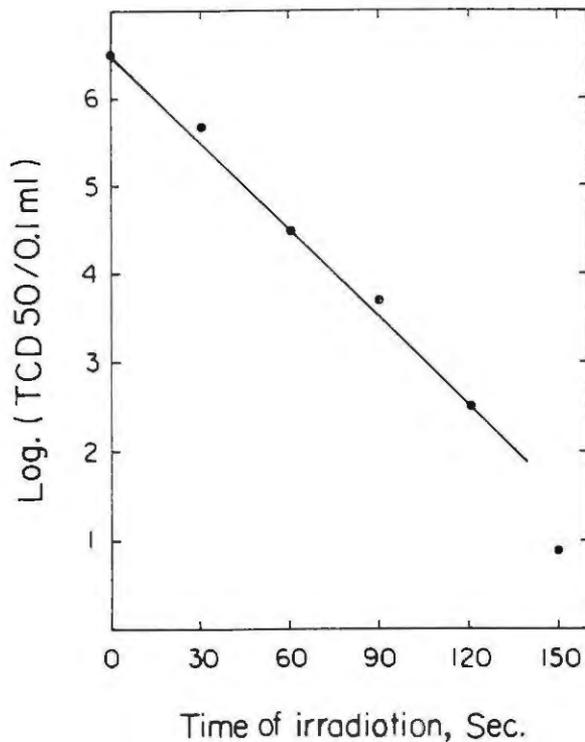
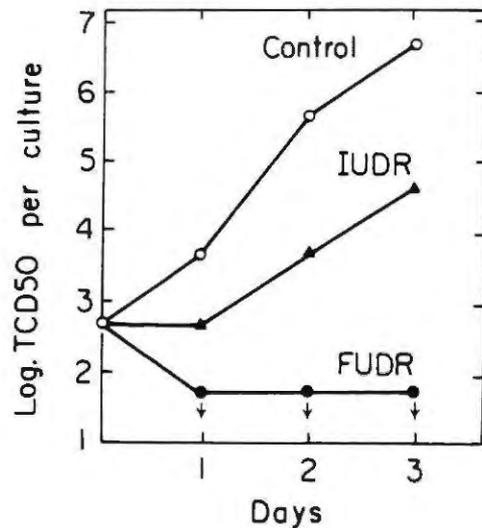


図5 Effect of IUDR and FUDR on the replication of virus at 36°



6. ウイルス感染価に及ぼす遠心の影響：表3に示すごとく、5,000 rpm 30分、あるいは

10,000rpm 30分の遠心は全く感染価に影響しないが100,000g 100分の遠心でウイルスは上清に残ると残らない。そしてsedimentからは約 $1/10$ のウイルス感染価が回収される。

7. ウイルス感染価に及ぼすsonicationの影響: 表4に示すごとく, 10KC30秒までの処理にウイルスは安定である。

表3

Effect of centrifugation on the infectivity of virus

Condition of centrif.	Material tested	Log ₁₀ TCD ₅₀ /ml
not centrif.		7.3
at 5,000rpm for 30min.	sup.	7.3
at 36,000rpm (100,000g) for 150 min.	sup.	2.3
	sediment	6.3

表4

Effect of sonication on the infectivity of virus

sonicated ^a (sec.)	TCD ₅₀ /ml
0	6.3
15	6.3
30	6.3
60	6.0
120	4.8
180	3.5

a. with IOKC

8. CsCl density gradient centrifugation: ³H-thymidine 標識ウイルスをCsCl density gradientにかけると図6に示すごとくradioactivityとinfectivityのpeakは完全に一致する。このpeakを示すfractionのbuoyant densityは1.21~1.22である。さらにこのfractionを再遠心すると再びinfectivityとradioactivityのpeakが一致する。これに対し³H-uridineを標識に用いた場合, ウイルスspecificなradioactivityのpeakはえられなかった。この結果からウイルスはDNAウイルスと考えられる。

9. ウイルスの凍結乾燥: maintenance mediumの状態ではウイルスを凍結乾燥すると完全に不活化されるが, 表5に示すごとく, 安定剤特にlactoseとpolyvinylpyrrolidoneの添加により安定した凍結乾燥が可能であり, 少なくとも室温2週間で凍結乾燥ウイルスの感染価は低下しない。

10. VSVとの干渉: ウイルス接種とvsv challengeとの間隔が2日以下, 5日以上で干渉はみられず3日が最も良い結果を示した。一方VSV challenge doseは10TC₅₀以下ではCPE発現が遅く干渉をみわけ難い。また多すぎてもCPEのgradeに差がみられず, 最もconstantに干渉がみられるのは50TC₅₀前後であった。干渉によってウイルスを

Density Gradient Centrifugation

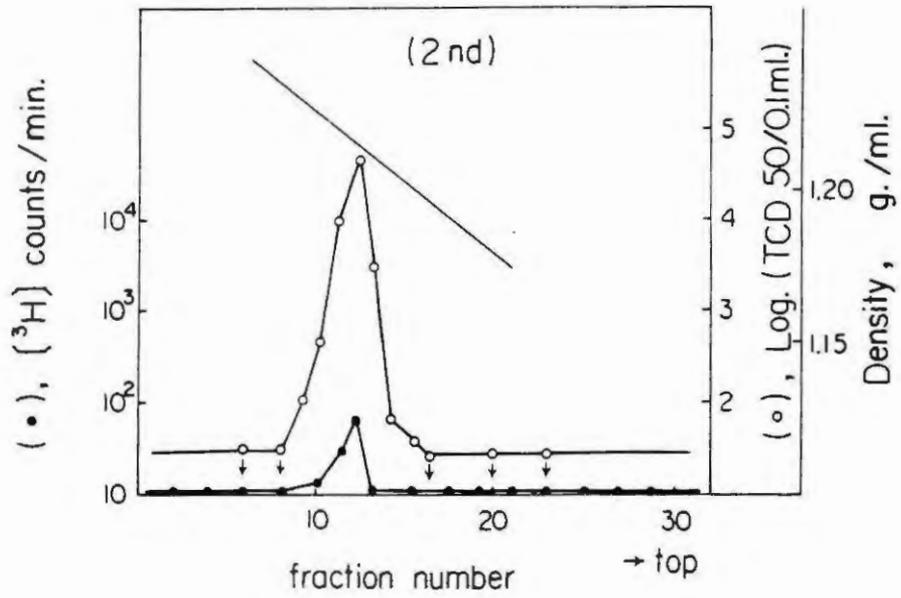
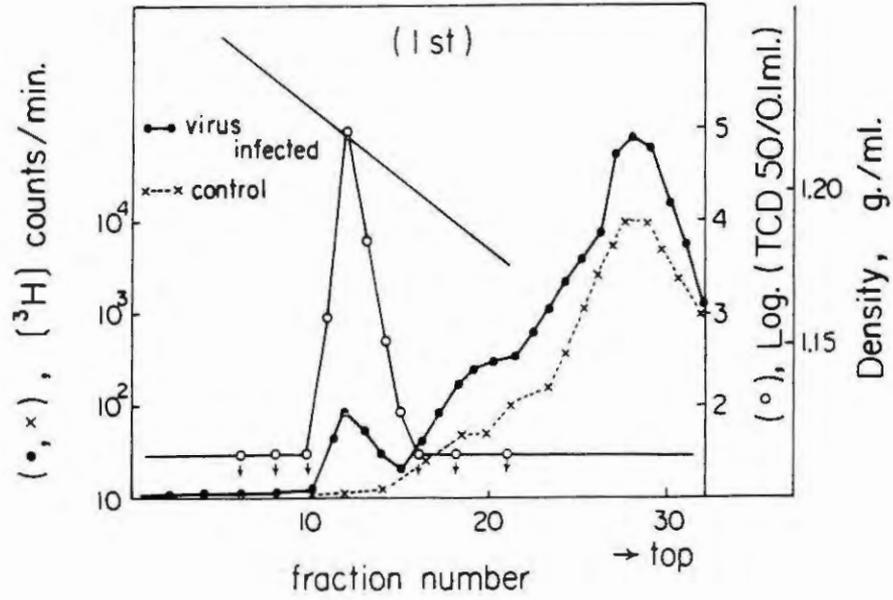


表 5

Lyophilization of the virus in different media

Medium	Before lyophy.	After lyophy. at 25C		
		0	7 days	14 days
The maintenance medium for BAT-6 cells ^a	7.3 ^b	<1.0	<1.0	
The maintenance medium plus equal volume of medium A	7.0	6.3	6.3	6.3
The maintenance medium plus equal volume of medium B	7.0	5.8	5.8	5.8

a. See the text.

b. Log₁₀ TCD₅₀ per 0.1 ml

Medium A = 10% lactose; 0.3% polyvinylpyrrolidone (K-90)

Medium B Sucrose 74.62g ; KH₂PO₄ 0.52g ; K₂HPO₄ 1.25g ; L-glutamic acid sodium salt 0.83g ; Albumin, Egg 10g in 1000 ml H₂O

assay した代表的 protocol を表 6 に示す。干渉は control fluid では表 7 に示すごとく全くみられない。また表 8 に示すごとくウイルス材料を 90,000 倍を 100 分遠心すると上清には干渉能がなくなり、沈査に証明される。表 9 に示すごとく干渉能は UV 感受性である。このように VSV との干渉はウイルス自体によるものと考えられる。しかし、constant にウイルスの感染価測定に利用できるほど条件は安定しない。この実験は名大永田教授の最初の観察に基づくものである。

表 6

A representative protocol of virus assay with interference

Virus dilution	Challenged with 35 TCD ₅₀ of VSV ^a		Log ₁₀ TCD ₅₀ determined by interference
	Grade of CPE of each tube ^b	Interference	
10 ⁻¹	2	+	6.8 / 0.1 ml ^c
	2	+	
	2	+	
10 ⁻²	3	±	
	2	+	
	3	±	
10 ⁻³	2	+	
	1	+	
	1	+	
10 ⁻⁴	1	+	
	1	+	
	±	+	
10 ⁻⁵	2	+	
	1	+	
	1	+	
10 ⁻⁶	1	+	
	1	+	
	2	+	
10 ⁻⁷	3	±	
	1	+	
	4	-	
10 ⁻⁸	4	-	
	4	-	
	4	-	
Control culture	4	-	
	4	-	
	4	-	

a. VSV was challenged after 3 days of virus inoculation.

b. CPE was observed after 2 days of VSV challenge.

c. Log₁₀ TCD₅₀ determined by CPE was 7.3 / 0.1 ml.

表 7

Failure of interference with control culture fluid of BAT-6 cells

No. of exp.	Materials for pre-treatment	Challenge dose (TCD ₅₀) of VSV	Interference	Log ₁₀ TCD ₅₀ / 0.1 ml determined by interference
1	infected fluid	40	+	6.3 ^a
	control fluid		-	
2	infected fluid	30	+	4.3
	control fluid		-	

a. Log₁₀ TCD₅₀ determined by CPE was 7.3 / 0.1 ml through the experiments.

表8 Effect of ultracentrifugation on interfering activity of the virus.

Materials for pre-treatment	Challenge dose (TCD ₅₀) of VSV	Interference	Log ₁₀ TCD ₅₀ /0.1ml determined by interference
pellet ^a	150	+	α 5.8 ^b
supernatant		-	
pellet	30	+	α 7.5
supernatant		-	

Virus was centrifuged for 100 minutes at 90,000g in the HITACHI RP30 rotor.

a Pellet was suspended in maintenance medium.

b Log₁₀ TCD₅₀ determined by CPE was 7.3/0.1ml through the experiments.

表9

Interference by UV-inactivated virus

UV-irradiated time (Sec.)	Log ₁₀ TCD ₅₀ /0.1ml determined by CPE	Interference	Log ₁₀ TCD ₅₀ /0.1ml determined by interference
0	6.3	+	6.5
30	5.5	+	5.8
60	4.3	+	4.8
90	3.5	+	3.5
120	2.3	+	2.3
150	0.8	-	<0.5
180	<0.5	-	<0.5

IV. 分離ウイルスの病原性—1971—

供試ウイルス株の history は研究材料の項を参照。

1. Sato株ウイルスについて：66匹の dd マウス新生児脳内接種の場合、9匹のみに立毛、体重減少、脳水腫などの所見がみられた。そして27匹の CF1 マウスについては異常は認められなかった。dd マウスの場合にも、一般には感受性を示さず litter によって時に感受性のものが観察されたと理解される。感染 dd マウスの脳内ウイルス量と血中中和抗体価を1カ月後のマウスについて検討した結果、表10に示すごとく、発病マウスの脳内ウイルス量は高く、血中中和抗体価は低いことが見出されたが、非発病マウスのウイルス感染価は低く中和抗体価は高かった。

表10 Relationship between the virus titer and the antibody titer in infected dd mice^a

Clinical Symptom	No. of mouse	Log ₁₀ TCD ₅₀ per 0.1ml in brain ^b	NT titer ^c
Yes	1	6.5	
	2	6.5	
	3		<20
	4	6.5	20
	5		20
No	1	5.3	40
	2	<1.0	160
	3	<1.0	160
	4		40
	5	5.5	40
Control	1	<1.0	<10
	2	<1.0	<20
	3	<1.0	<20

a. one month after inoculation

b. 10% brain suspension

c. 50% endpoint of serum dilution against 100 TCD₅₀

表11に示すごとく、C57BL/6マウスが脳内接種で感受性を示すことが見出された。ウイルス接種マウスは2～3週間以上の潜伏期を経て多くは体重減少、立毛、後期麻痺を示して発病する。発病マウスのうち軽症のものは回復、重症のものは殆んど死亡する。また組織培養原液のウイルス材料は発病をinhibitする傾向があるが希釈ウイルスは例えば30TCID₅₀でも発病する。C57BL/6マウスの場合にもlitterによって感受性は可なり異なる。したがって、各希釈あたりの供試litter数をますなどの工夫をしなければマウスで感染価を求めることは困難である。非感染の培養液あるいは特異的免疫血清で中和したウイルス材料ではマウスは発症しない。

表11 Susceptibility of C57BL/6 mice to Sato strain isolated in BAT-6 cells

Dilution	Lot No.	Infected cult. fluid		Control cult. fluid
		Log ₁₀ TCD ₅₀ per mouse	Results	Results
undiluted	A	6.5	0/7 ^a	0/8
	B	6.5	0/7	
10 ^{-0.7}	A	5.8	5/5 8/8 5/5 0/5	0/5 0/7 0/4
	B	5.8	0/4 1/4	0/5
10 ⁻¹	B	5.5	4/9 0/9	
10 ⁻²	B	4.5	1/10 5/7	
10 ⁻³	B	3.5	4/9 2/4	0/6
10 ⁻⁴	B	2.5	6/6 1/4	
10 ⁻⁵	B	1.5	0/5 5/5	
10 ⁻⁶	B	0.5	0/5 0/6	

a. No. of mice diseased / No. of mice observed

2. Watanabe並びにAoki株について：表12に示す如く、ヒト2倍体細胞に分離されたウイルスもBAT-6細胞に分離されたsato株ウイルスと同じ潜伏期並びに症状をもってC57BL/6マウスを発病させる。発病マウス脳乳剤からウイルスがBAT-6細胞に再分離される。対照群マウスの中でみられた立毛、体重減少を示したマウス脳からウイルスはBAT-6細胞によって検出されなかった。更に発病マウス脳から分離されるウイルスは中和試験によってSato株ウイルスと同一であることが確かめられた。Watanabe株についてはマウス脳継代も行われている。

3. Nishimata, Kishimoto株について：これらの株は患者脊髄液より直接C57BL/6マウス脳に分離したものであり、脳から再分離されたウイルスは中和試験によりSato株と同一であることが確かめられると共に、マウス脳で5代まで継代されている。表13参照。

4. 病理所見：岡山大学解剖学教室の新見教授によるとヒトとマウスの脊髄の比較解剖学的所見は図7のごとくである。

表 12 Susceptibility of C57BL/6 mice to Watanabe and Aoki strain isolated in human diploid cells

Virus used	Inoculum			Results	TCD ₅₀ /0.1 ml in the brain of diseased mouse ^b
	No. of passage	Log ₁₀ TCD ₅₀ per 0.1 ml	Dilution		
Watanabe - Hokkaido	2	6.0	undiluted	7/7 0/7 ^a	10 ^{6.5}
			10 ⁻¹	3/6	
	4	6.8	10 ^{-0.7}	8/8	
Aoki - Osaka	2	6.5	undiluted	5/5	10 ^{6.5}
Control culture fluid			undiluted	1/7 0/6	< 10 ^{1.0}

a. No. of mice diseased / No. of mice observed

b. 10% brain susp.

表 13

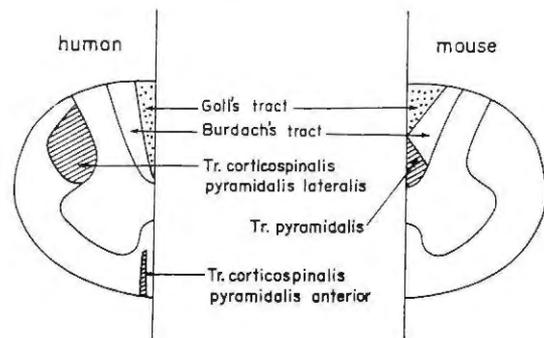
Direct inoculation of spinal fluid of SMON patients into C57BL/6 mice

Spinal fluid used	No. of passage	Inoculum		Log ₁₀ TCD ₅₀ per 0.1 ml	Results
		Dilution			
Nishimata - Hokkaido	1st	undiluted		5.3	2/5 ^a
	2nd	10% brain suspension		6.5	0/7 2/4
		1% susp.		5.5	2/5
	3rd	10% susp.		6.5	0/6
		1% susp.		5.5	1/7 0/6
	4th	0.1% susp.		4.5	9/9 2/4
		1% susp.		5.5	7/7
	0.1% susp.			4.5	1/6
Kishimoto - Okayama		1st	undiluted	6.3	0/4 3/8
	2nd	0.1% susp.	4.5	6/6	

a. No. of mice diseased / No. of mice observed

図 7

Comparative anatomy of spinal cord in man and mouse (After Prof. Niimi)



しかして、発病マウスの主要な病理所見は表 14 に示すごとくであって、Golli素の変化は頸髄に、そして錐体路の変化は腰髄あるいは錐体路全域に及んでいる。脳には変化はなく、また炎症反応はみられない。しかもこの種の所見は表 15 に示すごとく剖検マウス(重症例) 26 件中 19 例に観察された基本的所見である。

表 14

Main pathological changes observed in diseased mice

Symmetrical bilateral changes in the medial or central area of the posterior column in the spinal cord

- 1) pallor or demyelinated change (L.f.b)
- 2) Fragmentation and breaks in nerve fibers (Bodian)
- 3) Decrease in number of nerve fibers (Bodian)

表 15 Pathological findings in the diseased C57BL/6 mice

Group of exp.	Virus strain inoculated	Place isolated	Results	Total
1	Sato strain isolated in BAT-6 cells from stool of a patient	Okayama	6/9 ^a	
2	Watanabe strain isolated in human diploid cells from spinal fluid of a patient	Hokkaido	6/7	
3	Aoki strain isolated in human diploid cells from spinal fluid of a patient	Osaka	2/3	19/26 (73%)
4	Nishimata strain isolated directly in mice from spinal fluid of a patient	Hokkaido	4/5	
5	Kishimoto strain isolated directly in mice from spinal fluid of a patient	Okayama	1/2	
Control	Inoculated with control culture fluid		0/4	0/8
	Non treated		0/4	

a. No. of positive cases / No. of mice examined

5. 末梢感染症について：Watanabe株並びにAoki株について腹腔内並びに皮下接種による感染実験の結果，newborn C57BL/6マウスは脳内接種の場合と同じように発症することが見出されると共に，発病マウスの病理所見も脳内接種の場合と同一であることが確認された。末梢感染に対する感受性の程度等については現在検討中である。

V. 血清疫学（予報）

SMON患者血清は中和抗体価が低く，かつウイルスが髄液から高率に分離されること，一方健康な成人血清には中和抗体が普通検出されずウイルスも髄液から分離されないこと。更に同種ウイルスが髄液から証明された3例の無菌性髄膜炎の回復期血清が160～320倍と云う高い中和抗体価を示すことは既に指摘したところである。

その後，更に健康な成人血清63例（昭和44年7月採血）についてウイルス中和抗体をテストした結果，59例は<10倍で他の4例は≤20倍であった。後者にはSMON患者を家族にもつ1例が含まれている。これに対して，SMON患者の診療，看護に従事した10例の血清は6例が40～160倍の抗体価を示し，ウイルスの研究に従事した4例の血清はいずれも陽性で20倍1例，40倍1例，2例は160～320倍を示した。

V. 不活化ウイルスワクチンの試作(予報)

協同研究者 小沢恭輔(目黒研究所)

ウイルスはホルマリン0.05%の添加によって急速に不活化され、4℃48時間で感染価は $1/100,000$ となり、72時間でもはや検出されなかった。しかし、4℃30日間にわたって充分に不活化したものをワクチンとした。Human diploid cellで分離継代されたWatanabe株ウイルスの不活化ワクチンによって1回免疫では抗体反応はみられなかったが、3回以上免疫したマウスの血清には20~320倍の中和抗体価が証明された。

VI. 考 察

1. SMON患者の脊髄液から高率にBAT-6細胞に分離したウイルスは、human diploid細胞あるいはC57BL/6マウスにも直接分離することが出来るのでBAT-6細胞由来ウイルスの可能性は否定された。また、BAT-6細胞に観察されるCPEの判定の確かさはウイルス材料のblind testによって証明することが可能である。

2. 分離ウイルスはエーテル、FUDRに感受性でUVで不活化される。220 μ Millipore filterを通過するが100 μ は通らない。DNA型ウイルスでdensityは1.21~1.22 in CsClである。電子顕微鏡的形態は今後の研究として残される。

3. ウイルスはnewborn C57BL/6マウスに接種すると後肢麻痺を主として発病する。その病変は脊髄にみられるところの炎症反応を欠く系統変性病変であり、基本的にヒトのSMONと同じと考えられる。今後、病変部の電子顕微鏡的所見などが更に検討されねばならない。

4. キノホルム中止後に岡山大学小坂内科で観察されたSMON症例の脊髄液からも依然としてウイルスが分離される。

5. われわれは既にウイルスワクチンの試作について研究を進めているので、患者救済のために将来免疫血清の治療効果についても検討が望まれる。

6. SMON患者の脊髄液にC57BL/6マウスを発病死させるウイルスが存在すると云う極めて重要な事実を十分に評価し得なかったスモン調査研究協議会の運営と総括は極めて遺憾である。

7. 早い機会に外国における本ウイルスの感染状況の調査が望まれる。

VII. 結 論

SMONは免疫反応不全に伴う新種ウイルス感染症である。このウイルスを軸としてSMONを含めた病型あるいは疫学の全貌が解明されねばならない。

分離ウイルスはエーテルFUDRに感受性でUVで不活化される。220 μ のMillipore filterを通過するが100 μ は通らない、DNA型ウイルスでdensityは1.21~1.22 in CsClである。newborn C57BL/6マウスに接種するとマウスは後肢麻痺を主として発病する。発病マウスの病変は脊髄の炎症反応を欠く変性である。その病原性からみてウイルスは新種のSlow virusと考えてよい。

SMON患者脊髄液の新生マウス接種実験

松岡幸彦, 伊藤康彦, 木村吉延, 永田育也(名古屋大学医)

SMONの病因論として, 京大井上氏らによってウイルス説が強く主張され, 多方面の実験結果が報告されている。我々は井上氏らの実験結果の追試の一つとしてC57BL/6 新生マウスに井上-agent(渡辺株), SMON患者脊髄液を接種して, 体重の変動, 神経症状の発現, 死亡の有無, 及び病理組織学的検索を行った。

<animal>

- C57BL/6 ① 実中研
② 名大純系
③ 京大(井上氏の好意による)

<Sample>

渡辺株

- SMON患者脊髄液 ① K 株
② Y 株
③ A 株

×10にして使用

<接種方法>

0.02 ml を intracranial injection, intraperitoneal injection.
実験結果

脳内接種例について報告する。

渡辺株接種マウスで1/9, K株接種マウスで2/9 明らかな後肢の異常が認められた。即ち、『強制的に歩行を継続させた場合, 片側後肢に, 伸展したまま屈曲し得ない状態を生じた。しかし, これは一過性で, 休めばまもなく回復した。』

K株接種例では, 4 Wまでの死亡率が高く, 成長したマウスの9例中6例まで何らかの異常を認めた。後肢の異常を認めたマウスは(Fig 1) 体重減少が著しく, 出生后15日前後で成長が止まってしまう。後肢の異常については京大井上氏らの観察したものと同一ものと思われる。

病理所見

K株接種例3匹(接種後27日, 43日, 43日), 渡辺株 接種例2匹(34日, 35日), 対照1匹(47日)を井上氏らの方法により固定し, 脳, 脊髄の病理学的検索を行った。K株, 及び渡辺株接種例の中にはそれぞれ後肢の異常を示した一匹を含む。

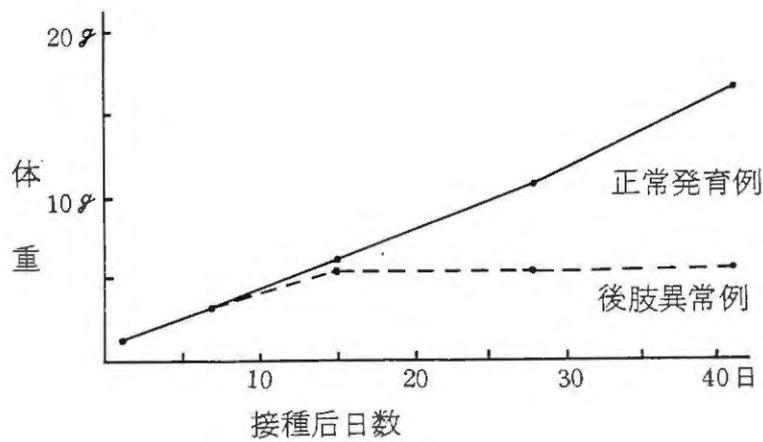
実験例のいずれにも, 対照に比して明らかに有意な病変は認められなかったが, 現在, この6匹以

外についても病理学的検索を続行中である。

腹腔内接種例，脳内接種で後肢の異常を示めさなかった例（Y株接種例）へのMTXの投与等の実験は経過観察中である。

	実験数	死亡	正常	マヒ	体重減
対 照	10	1	9	0	0
渡辺株 ($10^{6.5} / 0.1$)	10	3	5	1	1
K 株 ($10^{5.3} / 0.1$)	19	10	3	2	1 ⊗
Y 株 ($10^{4.8} / 0.1$)	16	3	13	0	0

⊗ Wasting を示めしたものの3匹



Sample の提供，実験方法についての advice を
名古屋大学・医・内科 祖父江助教授より受けた。

「井上ウイルス」の追試に関する 分担研究報告

奥野良臣, 高橋理明

山西弘一 (阪大 微研)

本年(1972) 2月2日, 京大ウイルス研究所井上幸重博士より凍結乾燥の「井上ウイルス」及びBAT6細胞の分与を受け, 以下の通り追試を行った。

1. CPEの観察

「井上ウイルス」浮遊液を階段希釈し, BAT6細胞を用いてtitrationを試みた。すなわち分与された「井上ウイルス」1バイアルを滅菌蒸留水1mlで溶解し, あらかじめ用意したBAT6細胞に10倍の段階希釈したウイルス液を1段階4本宛のチューブに接種し, 7日間観察した。

尚, 培養温度は35°~36°Cであり, 培地はEagle MEMに2% 仔ウシ血清を加え, PH 6.5であった。

観察の結果, 対照細胞に比し特異的なCPEは確認できず, 従ってウイルスの感染価は測定できなかった。

2. H³-thymidineのウイルス粒子へのとり込み

「井上ウイルス」をhuman embryo lung cellに接種し, H³-thymidineを培養液中に加え, 7日後にharvestしその上清を30,000 rpm, 120分遠心し, 沈渣部分を10mlのmediumにsuspendし, DNase処理したのち, 更に30,000 rpm, 120分遠心し, そのsedimentをsucrose density gradient(20~40%)上におき, 35,000 rpm 105分遠心したのち, dropwiseに集めて放射能を測定した。

その結果, 肉眼では遠心チューブに明瞭なバンドは見られず, アイソトープのカウントでもウイルス特異的と思われるpeakは見られなかった。

3. 「井上ウイルス」感染細胞の電子顕微鏡的観察

「井上ウイルス」感染human embryo lung cellの感染後7日目の超薄切片を作り, 電子顕微鏡で観察した。多数の標本について綿密に調べられたがウイルス粒子らしいものは見られなかった。なお, この実験は当研究所の新居助教授に依頼し, 同氏によって行われたものである。

井上博士のスモン関連ウイルスに関する追試

桜田 教 夫

(北海道立衛生研究所),

飯 田 広 夫

(北海道大学医学部細菌学教室)

要 約

井上博士らは昭和45年に北海道で採取された29件のスモン患者髄液から、B A T 6細胞を用いて23株のスモン関連ウイルスを分離した。われわれは同一材料についてC 5 7 B / 6マウスの脳内接種を行なったが発症したのは29件中3件であった。発症に要する日数は一定してなく、リッター中全部のマウスに発症はみられなかった。3例中1例のマウスの脳、肝、脾乳剤を継代したが陰性であった。

標準株である渡辺株をC 5 7 B / 6マウスの脳内と腹腔内に接種したところ、10倍希釈液の腹腔内接種マウスが13日目に発症したが他は全部陰性であった。

患者材料と標準株接種マウスの病理組織学的検査を行なったが、脊髄には対照に比較して特記すべき変化はみられなかった。

陽性であった患者髄液および標準株の原材料についてC 5 7 B / 6マウスに再接種を行なったがすべて陰性であって再現性はみられなかった。

結 言

スモンは患者発生の地域的な片寄り、夏季に比較的多いことから最初は病原微生物による感染が想定され、いくつかの細菌、マイコプラズマ、ウイルスが候補に上っていたが、いずれも追試による確認と再現性が不可能であって、最終的には井上博士らの主張するスモン関連ウイルスに的がしぼられるようになった。¹⁾

スモン関連ウイルスは最初はB A T 6細胞にのみ感受性があるとされ、B A T 6細胞における細胞病原性の判読と細胞の維持の困難なことから井上博士の周辺の一部の研究者によってのみ研究が進められていた。しかし昭和46年8月5日に開催された微生物部会、ウイルスグループの第1回研究会において井上博士はC 5 7 / B lack / 6系マウスが感受性が高く、脳内接種によって2~3週間後に発症、斃死することを発表し、本ウイルスの追試、確認の道が開かれた。

材料および方法

1) 患者材料

井上博士らがB A T 6細胞によって高率にスモン関連ウイルスを分離した⁽²⁾北海道のスモン患者髄液は昭和45年に北海道内の保健所、病院から送付された材料であって、-30℃のフリーザーに保存されてあった。これらの材料は送付後直ちに2分してあったので融解の影響は少ないと考えられる。

2)標準株

井上博士から分与された人2倍体細胞に増殖した渡辺株である。凍結乾燥アンプルの内容を1mlの滅菌蒸留水で溶してからEagle MEM pH6.5の希釈液で希釈した。

3)C57B/6マウス

主として脳内接種に用いたC57B/6マウスは日本クレア株式会社から妊娠マウスを入手し、出生後24時間以内の哺乳マウスの脳内に0.02~0.03ml接種した。接種後マウスは最初は1ヶ月、後に3ヶ月間観察した。

結 果

1)北海道のスモン患者髄液についてのスモン関連ウイルスの追試

スモン患者の髄液はそのまま、あるいは滅菌食塩水で5~10倍に希釈してからC57B/6マウスの脳内に接種した。結果は表1に示す通りである。

表1

コード	発病年月日	採取年月日	BAT6分離成績	C57/6 接 種	
				希 釈	成 績
SF 1	S44.9.10	S45.4.4	+	0	-
SF 6	S45.3.3	S45.4.4	+	1:10	-
SF 19	S45.5.8	S45.5.28	+	1:10	-
SF 24	S44.12	S45.6.4	+	1:5	-
SF 33	S44.5.5	S45.6.23	+	0	-
SF 38	S45.6.17	S45.6.24	-	1:5	-
SF 47		S45.6.9	+	1:5	-
SF 51	S45.6.15	S45.6.26	+	0	+
SF 55	S44.5	S45.6.23	-	0	-
SF 56	S45.1	S45.7.2	+	0	-
SF 59	S45.4	S45.7.2	-	0	-
SF 81	S45.6.20	S45.7	-	0	-
SF 82	S45.5.29	S45.7.24	+	0	-
SF 90			+	0	-
SF 94	S45.5	S45.8.10	+	0	-
SF 96	S45.4.16	S45.8.10	+	0	+
SF104			+	0	-
SF108			+	0	-
SF112		S45.8.6	+	1:5	-
SF113		S45.8.6	+	1:5	-
SF114	S45.4	S45.8.6	+	1:5	+
SF159	S45.6	S45.8.6	+	1:5	-
SF180		S45.9.5	+	1:5	-
SF187	S45.8.6	S45.8.6	+	1:10	-
SF191		S45.8.5	-	1:5	-
SF194		S45.10.1	+	1:5	-
SF196		S45.10.8	+	0	-
SF202		S45.10.8	-	1:5	-
SF206	S44.11	S45.10.30	+	1:10	-
計			23/29		3/29

29件の髄液をC57/6マウスの脳内に接種して3件が発症している(10.3%)。BAT-6細胞では23件が陽性であって分離率は非常に高い(79.3%)。発症例はいずれもBAT-6細胞陽性例と一致するが井上博士の研究室でC57B/6脳内接種陽性であったSF196はわれわれの追試では陰性であった。

発症したマウスは動作が緩慢になり、立毛、しんせん、四肢特に後肢のまひ、体重の減少がみられ、これらの症状は中村らの報告と一致する。⁽³⁾

発症に要する日数とリッター中の発症マウスの数は一定していない。表2にみられるようにSF51は10日目、SF96は17日目、SF114は15日目に発症している。またSF51は4匹中2匹、SF96は7匹中3匹、SF114は5匹中3匹のみが発症した。

表2

C57B/6の脳内接種後の発症マウスの経過

№ \ 日	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	
SF 51	● ● ●P ●P	● ●	○P ○P										
SF 96	○ ○ ○ ○ ○												
SF 114	○ ○ ○ ○												
Watanabe株 (10 ⁻¹ , i, p)	○ ○ ○ ○												

注： ○生存, ●発症, ●死亡, P病理組織学的検査

病理組織学的検査ではSF51は脳、脊髄に脱髄、細胞浸潤はなく、神経細胞に変化はみられなかった。SF96とSF114は対照に比較して特記すべき変化はない。

SF51, SF96, SF114については原材料を初回と同一の希釈を行ない、C57B/6マウスの脳内に接種したが陰性であった。

SF96の初回の接種の際、発症死亡したマウスの脳と肝、脾の乳剤を作り、それぞれ脳内と腹腔内に接種したが陰性であった。

対照としては正常人髄液2件、Eagle MEM pH6.5, 0.1%イーストエキストラクト加培地および同培地に2%胎児仔牛血清を加えたものを用いたが全例陰性であった。

C57B/6マウス接種により陽性であった髄液が採取された患者の病歴は次の通りである。

SF51は48才の女性で住所は空知郡北村字砂浜である。昭和40年6月15日に腹部症状が出現し、6月18日より両側の手指、肘、ひざに知覚異常が出現した。キノフォルム服用の有無は不明である。髄液は6月26日に採取された。SF96は釧路市の46才の女性である。昭和45年4月16日から下痢があり、エマフォルム1日1g、16日間の投与を受けた。6月3日よりしびれ感、6月10日より歩行不能を来した。髄液の採取は8月10日である。SF114は年齢不詳、小樽市の女性であり、昭和45年より下痢が出現し、メキサフォルム14錠の投与を受けた。6月よりしびれ、歩行障害を来した。髄液の採取は8月6日である。

2)標準株についての追試

標準株、渡辺株を1:5, 1:10, 1:1000の希釈を行なってから、1:5と1:1000は脳内、1:10を腹腔内に接種した。脳内接種分はすべて陰性であったが、腹腔内接種群は第2表にみられるように13日目に5匹中1匹が死亡し、14日目に4匹が発症した。発症した4匹中3匹は病理組織学的検査を行なったが残った1匹はその後回復し、生存し続けた。

発症マウスの病理組織標本(Klüver-Barrera染色)は昭和47年2月19日のスモン調査研究協議会微生物部、病理部合同会議の際、供覧したところ、病理部会の白木博士は脱髄はみられず、おそらくミエリン形成の抑制されたものであろうとの見解を述べた。

渡辺株はその後1:10希釈液を2リッターのC57B/6マウスの腹腔内に、1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000希釈液を脳内に接種したが全例陰性であった。

考 察

昭和47年3月13日に開催されたスモン調査研究協議会の総会において、スモンと診断された患者の大多数はキノフォルム剤の服用によって神経障害を起したものとする研究総括がなされた。しかし総括に述べられているように、患者発生の状況は地域的な集団発生とか、特定の病院、家族に集積する等、キノフォルムのみによってスモン患者が発生したと考えることの困難な場合もあった。

昭和47年7月20日に国立予研で開催された井上博士の提唱された因子に関する追試成績の検討会では、国立予研の腸内ウイルス部と病理部における成績の発表がなされた。C57B/6マウス脳内接種によっては発症マウスのリッター毎の頻度はきわめて低く、病理組織学的検査では正常マウスにおいても生後2週間までの哺乳マウスでは脊髄のミエリン形成の不全があることが指摘された。

われわれは現在スモンの感染説における病原体の唯一の候補である井上博士のスモン関連ウイルスについてC57B/6マウスを用いて追試を行なった。しかし実験成績では発症頻度はきわめて低かった。スモン調査研究協議会微生物部会第3回に井上博士は、同一材料を多数のリッターに接種すること、希釈材料を接種すること、観察期間を3ヶ月以上とすることを要請したが、これらの実験条件を守ったとしても結果的に陰性例が圧倒的に多く、しかも発症マウスの病理組織像に特異的な所見が

得られないことから、SMONがウイルス感染によるという確定的な根拠は乏しいものと考えられた。

本研究を遂行するに当り病理組織学的な検査に御協力戴いた石倉正嗣博士（北大第2病理）と奥山富三博士（札医大第2病理）に深謝する。

文 献

- 1) 井上幸重ほか：スモン調査研究協議会研究報告書. №3・31～44, 昭和46年.
- 2) Y.K.Inoue et al. Lancet. Vol.1:853-854, 1971.
- 3) Y.Nakamura et al. Lancet. Vol.1:223-226, 1972.

SMON 病原因子の検討

北原典寛，多ヶ谷 勇

(国立予防衛生研究所 腸内ウィルス部)

I 序

井上博士等はSMON患者由来の材料からBAT-6細胞にCPEを起す因子を分離し又この因子はC57BL/6, dd系等のマウスにRUNTING, 立毛, 四肢麻痺等の症状を惹起すると報告している。^{1, 2}

之等の報告の速やかな追試確認はかねがね望まれていたところであるが, BAT-6細胞を良好な状態に継代維持することが容易でないこと, CPEの判定がウイルスによる従来のCPEの場合と趣を異にすることから, BAT-6細胞におけるCPEの検討は容易ではないと考えられるのであるが, マウスにおけるRUNTING, 立毛, 四肢麻痺等の症状はその判定が比較的容易であると思われたので, BAT-6細胞におけるCPEの検討に先立って今回はマウスにおけるスモン因子の病原性についての井上博士等の報告の追試を行うこととした。

追試の方法としてはSMONと関連のある人由来の材料, 主としてリコールをその儘又は人胎児肺細胞を2回通過した後C57BL/6の生後24時間以内の新生児マウスに接種, 接種後3ヶ月間観察して異常の発生の有無をみることにした。試験したリコールのうち1例は名古屋大学永田教授から分与されたSMON患者のリコールであるが他は予研甲野, 多ヶ谷博士を介して入手されたもので之等材料の由来等の詳細については全く知らされていない。なお追試の具体的方法, 手技については混乱を避ける為に井上博士等の方法と可及的に同様の方法を採用することに努めた。

II 実験材料ならびに方法

マウスに接種した材料は次の通りである。

SL-Nagoya 0 : 名古屋大学永田教授から分与戴いたSMON患者からのリコールである。このリコールは井上博士に送付されBAT-6細胞でのCPEについて検討され陽性と判断されたものである。

SL-Nagoya P-2 : 上記リコールの人胎児肺細胞2回通過材料である。

SL-16.6 P-2 および SL-16.7 P-2 : 予研甲野, 多ヶ谷両博士を通じて供試されたりコールのうちの2例の人胎児肺細胞2回通過材料である。これ等のリコールについての詳細は知らされていない。

SL-16.0 P-2 : 供試リコールの人胎児肺細胞の通過と併行して, 最初の人胎児肺細胞培養への接種をblankにした外, リコールを通過したのと全く同様な処置をして得られた人胎児肺細胞培養液対照である。

リコール通過に用いた人胎児肺細胞は人胎児から直接準備されたもので, 10%牛胎児血清加 Eagle

氏液で継代したもので、リコールの通過にはその14乃至16代の継代を用いた。通過に当ってはリコールのEagle氏液での10倍希釈の0.1 mlを、ローラーチューブに完全にシートを作り培養液を2%牛胎児血清加Eagle氏液1 mlに交換された人胎児肺細胞に接種し、35±1°Cに1週間培養した後、その培養液のみを採集した。この培養液をEagle氏液で10倍に希釈したものの0.1 mlを再び初代通過と同様にして人胎児肺細胞を通過した後、培養液を採集3,500 RPMで20分間遠沈し、上清を2%牛胎児血清加Eagle氏液で10倍に希釈して保存した。リコール、人胎児肺細胞通過材料等はすべて常に-70°C以下(REVCO冷凍器)に保存した。

接種に用いたマウスはC57BL/6の生後24時間以内の新生児である。リコール原液又はその人胎児肺細胞2代通過材料を2%牛胎児血清加Eagle氏液で10倍に希釈したものの0.02~0.03 mlを脳内に接種した。観察期間は90日間とし、異常を呈したマウスは死亡寸前と判断される時期に予研病理部へ送付した。異常を認めなかったマウスもその一部を対照として病理部へ送付した。

III 実験成績

現在までに得られた成績を表1に示す。リコール材料接種群に接種後主として2~3週後CRUNTING、立毛、四肢麻痺を示すマウスが認められた。この症状を呈するものを一応発症と見做した。井上博士等は四肢麻痺と記載されているが発症と認められるマウスは無理に歩行を強いると当初歩行が困難であるが、繰り返して歩行を強いると可成りよく歩行する様になり、時間をおいて観察すると再び歩行困難になっており特異な歩行障害の症状であった。

表1. SMON材料のマウス接種成績

接 種 材 料	リ ッ タ ー 毎 の 成 績				
SL-Nagoya θ	$\frac{1(17)}{1(16)} / 0$	$\frac{2(15,15)}{0} / 0$	$\frac{0}{0} / 0$	$\frac{1(56)}{0} / 0$	
	6	4	6	9	
SL-NagoyaP-2	$\frac{1(13)}{0} / 0$	$\frac{0}{0} / 0$	$\frac{1(12)}{1(36)} / 0$	$\frac{1(22)}{1(22)} / 0$	$\frac{0}{0} / 1(8)$
	10	8	6	5	7 7
SL-No.6 P-2	$\frac{0}{0} / 0$	$\frac{0}{0} / 0$	$\frac{0}{0} / 0$		
	5	3	6		
SL-No.7 P-2	$\frac{1(11)}{0} / 0$	$\frac{1(17)}{1(74)} / 0$	$\frac{0}{0} / 0(53)$		
	5	7	10		
SL-No.0 P-2	$\frac{0}{0} / 0$	$\frac{0}{2(9,9)} / 0$	$\frac{0}{2(7,7)} / 0$	$\frac{0}{3(32,53,66)} / 0$	$\frac{0}{1(22)} / 1(66)*$
	6	9	4	7	7
	$\frac{0}{0} / 0$	$\frac{0}{0} / 0(31)$	$\frac{0}{1} / 0(59)$		
	8	5	6		
無 処 置	$\frac{0}{8(12,12,19,19,33,33,34,34)}$			$\frac{0}{2(14,14)}$	
	10			7	

マウスはC57BL/6, 接種材料の10倍希釈液0.02~0.03 ml を生後24時間以内の新生児の脳内に接種, 接種後3ヶ月間観察

SL-Nagoya θ: 永田教授より分与, SMON患者リコール原液

SL-Nagoya P-2: 上記リコールの人胎児肺細胞2回通過

SL-№.6 P-2 } リコールの人胎児肺細胞2回通過
SL-№.7 P-2 }

SL-№.0 P-2: 人胎児肺細胞培養液対照

$1^{\text{イ}}$ (17) = イ. 発症と見做されるマウス数
 $1^{\text{ロ}}$ (16) ロ. 明確な発症を認められることなく死亡したマウス数
 $0^{\text{ハ}}$ ハ. 正常の儘病理部へ送付したマウス数

 $6^{\text{ホ}}$ ニ. 括弧内のアンダーラインは病理部へ送付したマウスを示し, 数字は接種後病理部への送付迄の又は死亡迄の日数を示す。
 ホ. 3ヶ月間の観察数, リッター毎, 接種後1週間以内の死亡例を除く。

* このマウスのみは運動が活発でなく両後肢に運動障害が認められた。

材料接種群にも対照群にも明らかな症状の発見をみることなく死亡するマウスがあり, 発症と認められ病理部へ送付されたものを死亡としてリッター毎の死亡数を比較すると材料接種群と対照群との間に有意の差は認められなかった。(表2)

表2. 発症と見做されるマウス及び明らかな症状を認められることなく死亡したマウスのリッター毎の発生頻度

接種材料	リッター毎の発生頻度					
SL-Nagoya θ	2/6	2/4	0/6	1/9		
SL-Nagoya P-2	1/10	0/8	2/6	1/5-1	0/7	1/7
SL-№.6 P-2	0/5	0/3	0/6			
SL-№.7 P-2	1/5	2/7	1/10			
SL-№.0 P-2	0/6	1/9-2	0/4-2	3/7	1/7-1	
	0/8	1/5	1/6			
無処置	0/10-8	0/7-2				

発生数

接種後3ヶ月間の観察数

分母の減じた数は正常の儘病理部へ送付したマウスの数, 従って分子には含まれない。

しかし明らかに発症と見做されたマウスについてみると、対照群にはその発生はなく、発症と認められるマウスは材料接種群にのみ発生した。ただしその頻度は低く、リッター当たり2匹をこえることはなかった。

表3. 発症と見做されるマウスのリッター毎の発生頻度

接種材料	リッター毎の発生頻度					
SL-Nagoya θ	1/6	2/4	0/6	1/9		
SL-Nagoya P-2	1/10	0/8	1/6	1/5-1	0/7	0/7
SL-No. 6 P-2	0/5	0/3	0/6			
SL-No. 7 P-2	1/5	1/7	0/10			
SL-No. 0 P-2	0/6	0/9-2	0/4-2	0/7	0/7-1	
	0/8	0/5	0/6			
無処置	0/10-8	0/7-2				

発生数

接種後3ヶ月間の観察数

分母の減じた数は正常の儘病理部へ送付したマウスの数、従って分子には含まれない。

IV 考 察

井上博士等の報告する新生児マウス脳内接種により惹起される症状即ち立毛, RUNTING

四肢麻痺を呈するものがリコール材料を接種したマウスにみられた。対照群にはその様な症状を示したものはなかった。しかしながらRUNTING, 立毛, 歩行障害等の症状を呈したものは1リッターに1又は2匹で、井上博士等の報告の如く高率には認められなかった。又対照群にも死亡するものがあり、それ等の死亡例にはRUNTING, 歩行障害等は認められなかったが、単に死亡したマウスの数から判断するとリコール材料接種群と対照群との間に差は認められなかった。しかし明らかにRUNTING, 歩行障害を呈したマウスの発生は対照群には認められなかったことから、この発症は接種されたリコール材料と何等かの関連を有するものと考えられる。

表に示された成績は何れもリコール又はリコールの人胎児肺細胞の2代通過材料を10倍に希釈したものを接種して得られた成績であるが、更に高希釈の材料を接種した場合の異常マウスの発生頻度

を検討することが必要であり、又異常を呈したマウスの材料からの継代実験を行うことが肝要である。しかしながら異常を呈したマウスが特異的な発症であるか否かを確定する方法が現在のところ未だ無く、又異常を呈するマウスの発生頻度が低いので、接種材料の稀釈と異常マウスの発生頻度を定める実験、マウスによる継代実験を行うことは極めて困難であると考えられる。

この点を解決するために材料接種による異常マウスの発生頻度を高める何等かの方法を見出すことが望まれる。

ENDOXAN(塩野義)の使用を一部試みたが予備実験の域に留った。

V 要 約

井上博士等のSMON因子のマウスに対する病原性についての報告の追試を行った。

供試されたリコール材料を接種されたマウスに井上博士等の報告の如くRUNTING, 立毛, 歩行障害を呈するものが認められた。しかしその発生頻度は低かった。

接種材料の稀釈に伴う発症頻度の検討, 継代実験による検討を行うにいたらず, SMONの病原因子の存否を定める明確な成績を得るに至っていない。

文 献

- 1) 中村良子, 井上幸重: SMONのウイルス学的研究 II. 分離ウイルスの病原性 1971, ウイルス ㊦21巻㊦3号, ㊦19回日本ウイルス学会総会記録 P. 92~95.
- 2) Y. NAKAMURA, Y. KANDA INOUE: Pathogenicity of Virus associated with Subacute Myelo-Optico-Neuropathy 1972, Lancet, Jan. 29, P. 223~226.

SMON 病原因子の検討

2: 接種マウスの病理組織学的検索

内田 信之, 大川 時忠,
橋本 魁, 江頭 靖之

(国立予防衛生研究所病理部)

I 序

井上等の提唱する SMON 病原因子につき、予防衛生研究所腸内ウイルス部の北原等はマウスを用いて実験を行った。吾々は病原因子接種マウス(発症したと思われるマウスを含む)と、対照として培養液のみを接種したマウス及び無処置マウスを剖検し、主として中枢神経系の所見を観察した。これとは別に、井上等の実験において C57BL/6 マウスは発症し病変も起るが、dd マウスでは起らないという現象を理解するために、病理部において飼育した2系統(C57BL/6 と ddY)の無処置マウスの中枢神経系を組織学的に生後3~30日間観察し、これら両系列の材料の観察結果から病変を検討した。

II 実験材料ならびに方法

接種材料、接種法は北原等の報告に記載されている。

異常を呈したマウスは、概ね死亡直前の状態で病理部に渡された。マウスの組織固定は井上博士から送られたメモに記載された方法にできるだけ忠実に従って組織像の解釈以前の問題がないように努力した。即ち、Nembutal (Abbott Lab. 製) 60 mg/Kg をマウスの腹腔に接種し、深麻酔下で胸部を切開し、固定液(主成分は paraformaldehyde)に連なる注射針を左心室に穿刺し、右心耳を切断してから除々に灌流固定を行った。中枢神経系の取出し方や其他についても井上等の方法に準じて行った。

組織の脱水、パラフィン包埋、薄切等は通常の組織標本製作法に従い、染色はヘマトキシリン・エオシン2重染色、髄鞘について luxol fast blue 染色及び軸索について Holmes の鍍銀法を用いた。なお適宜これらを重染色として全一標本に利用した。

III 実験成績

A. 北原らの実験マウスの病理組織学的検索.

病理所見の記載の便宜のためにマウスに個体番号をつけた。従って北原等の表2にこの個体番号を加えたものを表1にかかげた。番号の初めの数字はリッターの番号で、後の数字は個体のリッター毎の通し番号である。マウスへの接種は生後24時間以内に行われたので接種後日数と生後日数は同一とみなしてよい。組織学的に検索した接種群と対照群のそれぞれの検索時期と個体番号を表2にまとめた。

表1.

C57BL/6マウスのリッター毎の発症並に死亡

発生頻度と組織検索番号表

(北原の表1, 2を参照せよ)

接種材料	発生頻度	マウス №	発生頻度	マウス №	発生頻度	マウス №	発生頻度	マウス №
SL-Nagoyaθ	2/6	№ 2-1	2/4	№ 4-1 4-2	0/6		1/9	
SL-Nagoya P-2	1/10	№ 21-1	0/8		2/6	№ 23-1	1/5-1	№ 24-1 24-2
	0/7		1/7					
SL-№6 P-2	0/5		0/3		0/6			
SL-№7 P-2	1/5	№ 8-1	2/7		1/10			
対	SL-№0 P-2		1/9-2	№ 19-1 19-2	0/4-2	№ 20-1 20-2	3/7	
		1/7-1	№ 27-1	0/8	1/5		1/6	
照	無 処 置	0/10-8	№ 7-1 7-2 7-3 7-4 7-5 7-6 7-7 7-8	0/7-2	№ 11-1 11-2			

表 2.

接種材料別の発症頻度と
組織検索例の接種後日数表

接種材料	マウス数			組織学的検索		
	全数	発症	非死発症	匹数	個体番号	接種後日数 (生後日数)
SL-Nagoya θ	25	4	1	3	4-1 4-2 2-1	15 15 17
SL-Nagoya P-2	43	3	2	4	23-1 21-1 24-1 24-2	12 13 22 22
SL-№6 P-2	14	0	0	0		
SL-№7 P-2	22	2	2	1	8-1	11
対 照	SL-№0 P-2 (培地接種)	0	7	5	20-1	7
					20-2	7
					19-1	9
					19-2	9
					27-1	66
	無 処 置	0	0	10	7-1	12
					7-2	12
					11-1	14
					11-2	14
					7-3	19
7-4					19	
7-5					33	
7-6					33	
7-7	34					
7-8	34					

(1) 接種群の病理所見： マウスに病原因子を接種後病理学的検索したうち最も早い例は11日(168-1)である。この例は脊髓の頸、胸、腰髄について脊髓錐体路がluxol fast blue(以後LFBと略す)に染りが弱い(写真1)。12日例(1623-1)の症状としては、北原等の記載にあるように発症していたが、剖検で極めて強い脳水腫が認められた(写真2)。このマウスの組織所見としては胸髄と腰髄の錐体路のLFBの染色性が弱い、他の部分も染色性がある程度弱かった。従って脊髓錐体路のみの特異的病変とは考えられなかった。

15日例(164-1, 4-2)は2匹とも頸髄の錐体路が他の部に比してLFBの染色性が弱かった(写真3)。17日例(162-1)は、脊髓上部の錐体路のLFB染色性が弱かったが、腰髄は一部染色性を示す処があった。

22日例の1624-1は症状を示し、1624-2は症状を示さなかったが、2匹とも胸髄の錐体路のLFBの染色性が弱かった(写真4, 6)。1624-1の腰髄は髄鞘の通常存在する部分はすべてLFBに良い染色性を示した。なを1624-2は症状がなかったが脳水腫が強く、脳皮質は萎縮し、中枢神経系の発育障害があるものと考えられた(写真5)。

以上の脊髓錐体路のLFBに対して染色性が弱い部分を鍍銀法によって軸索を検索した。併し顕著な変性は見られなかった。ただ脊髓錐体路には、対照群においても全じであるが、少数の散在する太い軸索が分布していて、他の後索知覚領域の中間の太さの軸索の密集している分布と比較すると、前者は鍍銀法によって染色性が薄めに、後者はやや濃く見えると云う相異は見出された。

(2) 対照群の病理所見： 対照として生後7~66日迄C57BL/6, 15匹を検索した。

7日例(1620-1, 20-2)は2匹とも脊髓の髄鞘の染色性がやや少ないが、特に錐体路の染色性が弱く、他の部分との間に差があった(写真7)。9日例(1619-1, 19-2)は2匹とも脊髓の髄鞘は全般的にLFBに対してやや染色性が弱い、錐体路が特に染色性が弱かった。

14日例(1611-1, 11-2)は1611-2の腰髄を除いて、脊髓錐体路のLFBに対する染色性がやや弱かったが、殊に1611-1の胸髄の錐体路は明らかに染色性が弱かった。19日例(167-3, 7-4)は2匹とも脊髓錐体路のLFBの染色性が弱かったが、特に167-4の頸髄の錐体路は弱かった(写真8)

33日例(167-5, 7-6), 34日例(167-7, 7-8)は何れの部分でも、髄鞘がLFBに良く染っていた(写真9)

66日例(1627-1)は発育悪く、発症類似の症状を示したので検索した。脳には、脳水腫による脳室拡張があり、脊髓の髄鞘存在部位はLFBに良い染色性を示し、腰髄の錐体路は他より寧ろ強く染っていた。

B. C57BL/6系とddY系との脊髓発育段階の比較.

病理部において飼育したC57BL/6とddYを生後3~30日組織学的に検索した。C57BL/6は髄鞘のLFBに対する染色性が全般的に10日頃まで弱く、特に錐体路の部分が弱い(写真10,

11)。30日になると脊髓髄鞘の染色性が錐体路でむしろ強くなっている。これに比べて軸索は10日頃より染色性が良くなる。これに対してd d Yの脊髓髄鞘の染色性は5日までやや弱く、特に錐体路は殆んど染っていない(写真12)。10日になると髄鞘の染色性が出て来るが、錐体路はやや染色性が弱い。軸索はC 5 7 B L / 6と全じく10日以後染色性が良くなる。

Ⅳ 考 案

井上等の論文においては、中枢神経系のうち殊に脊髓の後索に特有な変化があり、これはヒトのS M O Nに類似の病変であると記載してあるので、吾々もこの点に特別の注意を払いつつ観察した。

以上の吾々の検索結果から見ると井上等の因子を接種したマウスのうち少数は、脊髓錐体路の髄鞘のL F Bに対する染色性が弱い(写真1, 3, 4, 6,)ことは確かである。しかしこれらの例の軸索を検索した限りでは特に変性があるとは見えなかった。即ち少なくとも軸索変性と髄鞘の変性とが共存する病巣は観察されなかった。

なお接種群の何れにおいても脊髓後索知覚領域に変化は見られず、ヒトのS M O Nの時に見られる知覚領域に特に強い変化を示す所見と比較すると相異があることになる。

更に対照例を検索すると、19日例及びそれ以前においては、脊髓錐体路髄鞘のL F Bに対する染色性は弱いことがわかった(写真7, 8)。一般にL F Bに対する染色性は、生後一定の期間に生理的に次第に現われてくるものと考えられる。なお33, 34, 66日の対照例では、この時期に髄鞘が完成しているためか、錐体路の染色性もよくなっている。

これらの所見をよりよく理解するために更に、北原等の実験とは別に飼育したC 5 7 B L / 6系とd d Y系マウスについても、観察を行い、その結果マウス幼若時の髄鞘の染色性についての知見はかなり確実になったと思う(写真10, 11, 12)。

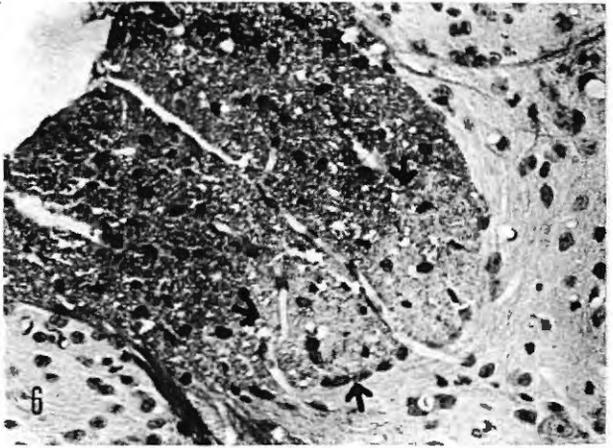
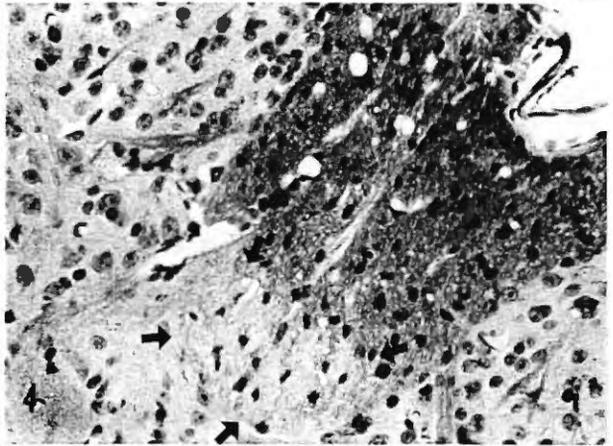
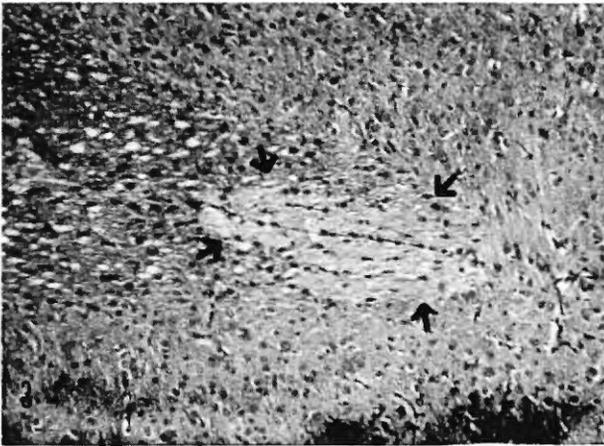
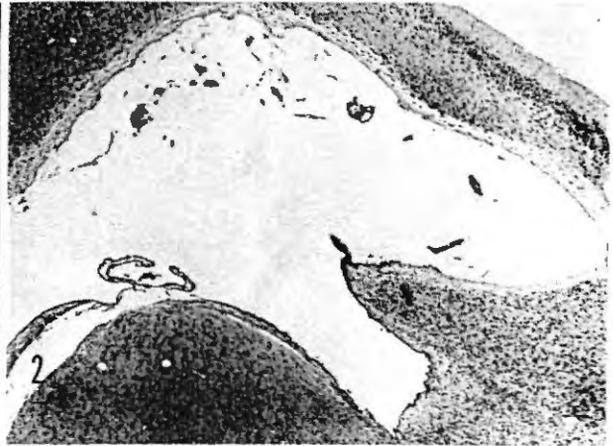
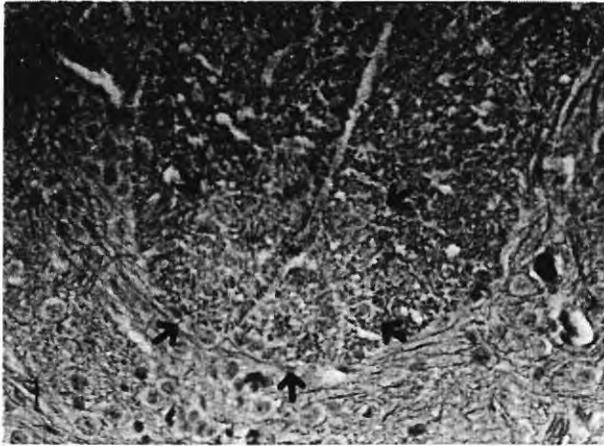
又接種群、対照群の何れにも脳水腫を示す例があった。

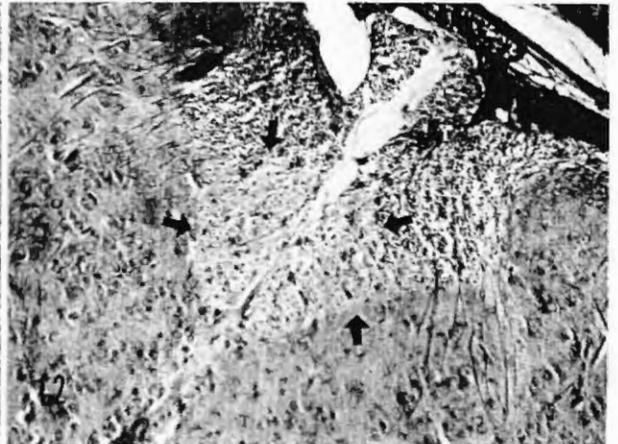
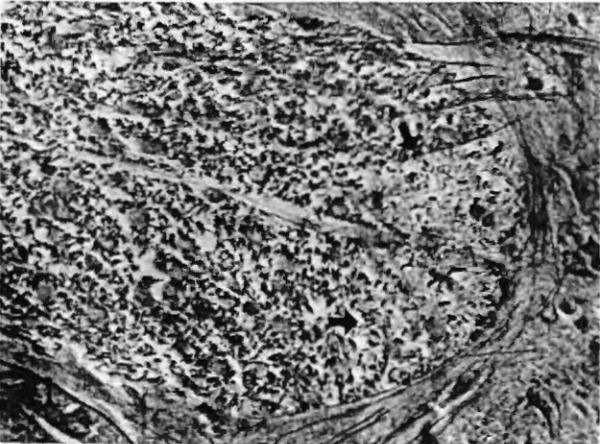
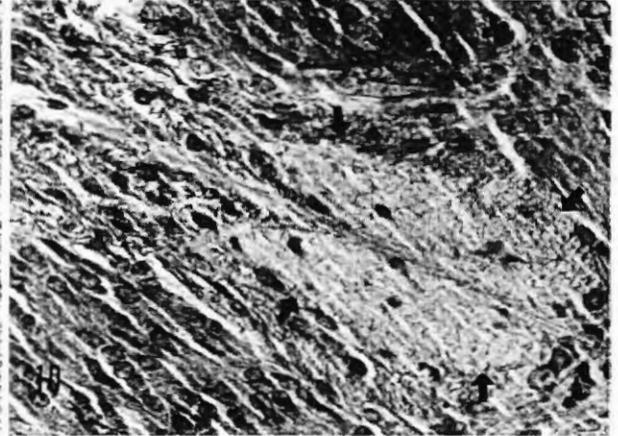
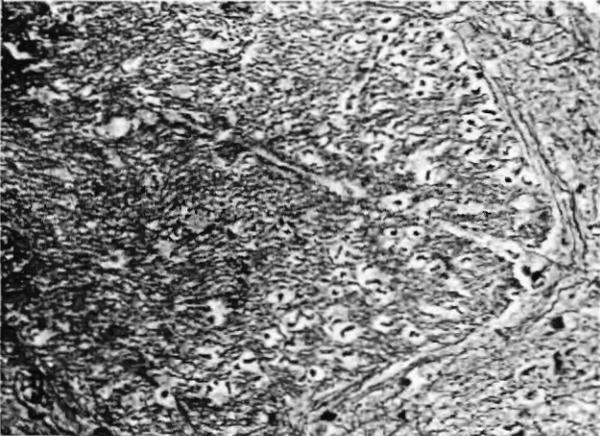
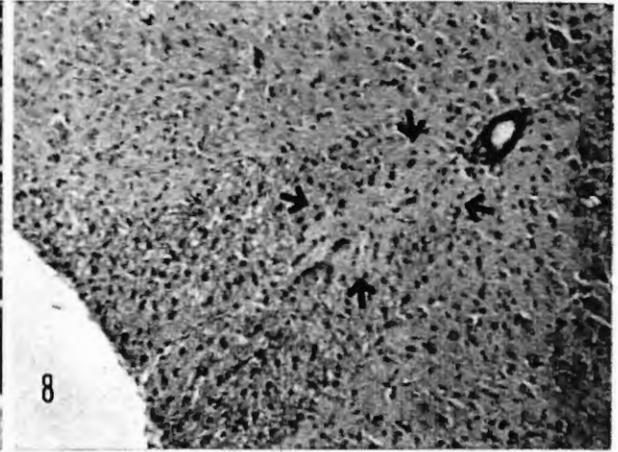
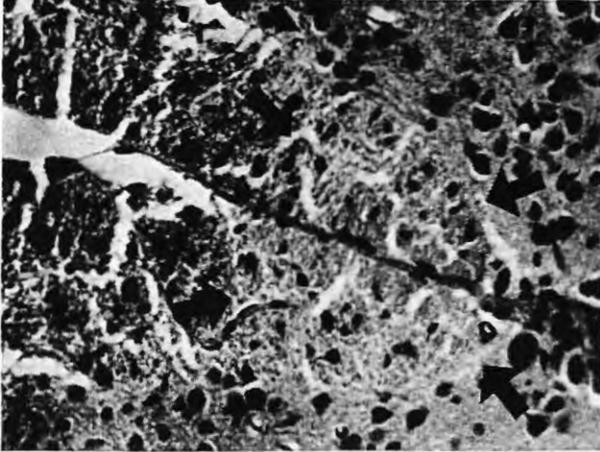
以上の所見から考えると、上記接種群マウスに見られた脊髓錐体路の髄鞘のL F B染色の弱さを髄鞘の変性と解して、その組織像と井上等の病原因子を接種したマウスのうち少数に起った臨床症状とを関連づけ、組織像と病原因子との間に直接の因果関係を求めるのにはなお問題があり、更に今後の検討を必要とするものと考えられる。

又ヒト胎児肺細胞培養液のみを接種した群で死亡例がかなりあるが、所謂発症とみなされる症状を示して死亡する例が少いことの原因も追求する必要があると思われる。

Ⅴ 結 論

井上等の病原因子を検討するために北原等がC 5 7 B L / 6系マウスを用いておこなった実験について、病原因子接種マウスと対照マウスの中枢神経系、とくに脊髓を組織学的に検索した。同時にd d Y系マウスを対照としておこなったマウス脊髓についての髄鞘の発達時期を追求した実験結果をも考慮すると、脊髓錐体路の髄鞘の弱染性と病原因子接種との間に直接の因果関係があることを肯定できる結果を得るにいたらなかった。





写真説明

矢印はすべて脊髄錐体路と他の部分の境を示す。

1. №8-1, SL-№7 P-2接種. 11日. 胸髄後索. Holmes-LFB重染色, ×250.
2. №23-1, SL-Nagoya P-2接種. 12日. 大脳(脳室拡張). HE2重染色, ×25.
3. №4-1, SL-Nagoya θ接種. 15日. 頸髄後索. LFB染色, ×100.
4. №24-1, SL-Nagoya P-2接種. 22日. 胸髄後索. LFB染色, ×250.
5. №24-2, SL-Nagoya P-2接種. 22日. 大脳(脳室拡張). HE2重染色, ×25.
6. №24-2, SL-Nagoya P-2接種. 22日. 胸髄後索. LFB染色, ×250.
7. №20-1, SL-№0 P-2接種. 7日. 頸髄後索. LFB染色, ×250.
8. №7-4, 無処置. 19日. 頸髄後索. LFB染色, ×100.
9. №7-6, 無処置. 33日. 腰髄後索. LFB染色, ×250.
10. C57BL/6, 正常無処置. 3日. 胸髄(斜断)後索. Holmes-LFB重染色, ×250.
11. C57BL/6, 正常無処置. 10日. 胸髄後索. Holmes-LFB重染色, ×250.
12. ddY, 正常無処置. 5日. 頸髄後索. Holmes-LFB重染色, ×100.

参考文献

- Nakamura, Y., Kanda Inoue, Y. Lancet, 1972, 7744, 223.
Pathogenicity of virus associated with subacute myelo-optico-neuropathy.

スモン研究班報告

石田 名香雄, 中村 喜代人

(東北大・医・細菌)

はじめに

分離ウイルス学は発病病理機構の解明にまで責めを負わねばならない。われわれはかねてからスローウイルス感染症に興味をもち、その病理機構をin vitro系に於て理解することを目標にして研究をつづけており、この立場からスモン研究班に参加している。近年、SSPEの病原体としての麻疹ウイルスが脚光をあびて来たが、その発病病理機構に関しては全く推定の域を出ず、単にそれを解析するための手がかりを得たと云うに過ぎない。本疾患に代表されるように、スローウイルス感染症の多くは中枢神経系を主な病変の場としている。このことは

- 1) 脳に於けるウイルスの増殖は、いわゆる致死感染系とは可成り異なったパターンを示しているのではないか。
- 2) また抗体存在下でもウイルスが存続し得るような条件を備えているのではないか。

と云う可能性を考えさせる。このような可能性をラット由来のグリオーマ細胞と麻疹ウイルスの系を用いて検討した。

材料と方法

1. ウイルス：麻疹ウイルスEdmonston株のHela-S3細胞継代培養液を親ウイルスとして用い、感染価の測定はVero細胞を用いたブラック法で行った。
2. RG-6細胞：ラットグリオーマ由来のクローン化細胞(P. Benda et al., Science 161, 370, 1968)で、慶大医学部中沢博士から分与を受けた。培養には10%の牛血清を含むMEMを用いた。
3. 蛍光抗体法：麻疹ウイルスに対して高い中和抗体価をもつ成人血清を一次抗体とする間接法で行った。
4. 抗麻疹ウイルス家兎血清：S3細胞で増殖したウイルス液で家兎を免疫して得られた血清で512倍の中和抗体価を示すものを用いた。

実験成績と考察

1. RG単層培養に麻疹ウイルスをm.o.i. 10倍で感染させると、感染後24時間目から抗原合成細胞が出現し、以後急速にその数を増し、30~48時間で最大値に達する。しかしその時の抗原合成細胞は全体の5%を占めるに過ぎず、残りの95%の細胞では抗原の合成は認められない。
2. これらの抗原合成細胞の数とVero細胞上での感染中心の数とは一致することから、ウイルス感染グリオーマ細胞は完全なウイルスゲノムを持つものと思われる。
3. 次にこれらの細胞での感染性粒子の合成を検討した。RG細胞をm.o.i. 4で感染させreleased

virus及びcell-associated virusを経時的に測定したところ、両者共に最大値は感染中心の数の1/10に過ぎない。このことはグリアの感染細胞内ではウイルスの感染を極端に妨げるような機構が存在していることを示唆している。

4. 既に述べたように大部分のグリア細胞では抗原の合成を認めることは出来ないが、これらの細胞は麻疹ウイルスの感染に遺伝的に抵抗性をもつ細胞集団なのであろうか。RGから略ぼ50ケのクローンを得てウイルス感染を行ったところ、完全に抵抗性を示すクローンを得ることは出来なかった。

5. RG細胞集団に対するウイルスの吸着効率をS3細胞集団に於けるそれと比較したところ、両者間に有意の差を認めることは出来なかった。このことは抗原合成を行っていない細胞でもウイルスの吸着は起こっているものと思われる。しかしそれ以後の過程については不明である。

6. RG細胞でのウイルス粒子の合成は非常に少ないが、感染細胞はすべてVero細胞上で感染中心となり得る。そこでウイルス感染RG細胞からVero細胞へのウイルス伝播様式を抗血清を用いて解析した。ウイルス感染RG細胞を抗体を含む培地に浮遊しVero細胞の単層培養に接種し培養を続けると、3日目にウイルス抗原をもった巨細胞が出現する。このことはRG細胞からVero細胞へのウイルス伝播は中和抗体の作用を受けない形で進行する事を意味する。またRG細胞は巨細胞を作らないのでVero細胞間のウイルス伝播も同様の機構によって起こっているものと思われる。

ま と め

1. 麻疹ウイルスをラットグリオーマ由来のRG-6細胞に感染させると、5%の細胞にしか抗原合成を認めることが出来ない。その細胞での成熟粒子の形成は平均0.1ケ以下であるが、その細胞はVero細胞上ですべて感染中心となり得る。残りの95%の細胞は遺伝的に抵抗性をもつものではなく吸着過程は正常に進行するものと思われる。従ってRG細胞に於ては吸着以後のウイルス増殖過程を強く抑制する機構が存在し、しかもその抑制の度合は細胞側の生理的条件によって種々の程度に表現されるものと思われる。

2. 麻疹ウイルス感染RG細胞及びVero細胞から非感染Vero細胞へのウイルス伝播は中和抗体の存在下にも進行する。その機構は不明であるが、その事は脳に於けるウイルス存続の理解に役立つものと思われる。

スモン調査研究協議会研究報告書

№. 10

昭和46年度微生物部会研究報告

昭和47年3月25日発行

発行所 スモン調査研究協議会
東京都品川区上大崎2-10-30
国立予防衛生研究所内

代表者 甲野礼作

印刷所 瑞穂印刷産業有限会社
渋谷区幡ヶ谷3-69-5